

КЛИМУК Б.Т.^{1,2✉}, ДУГАН О.М.¹, СТЕФАНОВИЧ А.В.², КЛИМЕНКО С.В.²

¹ Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,

Україна, 03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37, e-mail: bogdana11@ukr.net

² Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України»,

Україна, 02000, м. Київ, просп. Перемоги, 119, e-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk

✉ bogdana11@ukr.net, (097) 746-94-42

РЕЗУЛЬТАТИ МУТАЦІЙНОГО СТАТУСУ ГЕНА *HER-2/NEU* У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ В УКРАЇНІ

Виявлення змін рецептора епідермального фактора росту 2 (*HER-2/Neu*) в клітинах пухлин має вирішальне значення для оцінки прогнозу пацієнта, прогнозування реакції на стандартну хіміотерапію, а також визначення перспектив лікування анти-*HER-2*-терапії [1]. Згідно з востаннє оновленими рекомендаціями ASCO/CAP, тестування *HER-2/Neu* сьогодні здійснюється шляхом імуногістохімічного оцінювання експресії білка *HER-2/Neu* або за допомогою ампліфікації гена *HER-2/Neu* методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) чи хромогенної гібридизації (CISH) [2, 3]. Аналіз FISH вважається «золотим стандартом» для діагностування мутаційного статусу гена *HER-2/Neu* у пацієнтів із раннім або прогресуючим раком молочної залози (РМЗ).

У 2007 році спільна експертна комісія, створена Американським товариством клінічної онкології (ASCO) і Коледжем американських патологів (CAP), опублікувала рекомендації, що стосуються періодичності і методів тестування експресії *HER-2/Neu* (так званій ERBB2) [3, 4].

Надалі надавалися роз'яснення та поновлення до рекомендацій ASCO/CAP щодо *HER-2/Neu* тестування [5–7]. Під час чергового перегляду рекомендацій у 2013 р., ASCO змінює інтерпретацію результатів діагностичних тестів для підвищення якості тестування експресії *HER-2/Neu* [8].

Критерії від 2013 року точніше визначають пацієнтів, яким можна призначати цільові препарати [9], особливо у разі використання подвійного зонда FISH. З точки зору оцінки мутаційного статусу гена *HER-2/Neu*, було доведено, що ампліфікація центромерного регіону може призводити до помилкових результатів інтерпретації *HER-2/Neu* за використання

FISH [10].

За використання рекомендацій 2013 р. ASCO/CAP оцінки експресії гена *HER-2/Neu* ISH, кількість сумнівних [11, 12] та позитивних [13] випадків значно збільшилася, оскільки число копій гена стало важливим фактором для прийняття рішень незалежно до співвідношення кількості центромер хромосоми 17 у хворих на РМЗ.

Використовуючи сучасні рекомендації тестування *HER-2/Neu* зазначимо, що у 8–10 % пацієнтів результати FISH є неоднозначними, у яких отримують неоднозначні результати. Подальше тестування *HER-2/Neu*-сумнівних випадків за FISH-фарбування набору додаткових FISH зондів може встановити позитивність або негативність зразку. Основними причинами, що зумовлюють неоднозначність результатів FISH тестування є ампліфікації центромерної ділянки, а також ко-ампліфікації гена *HER-2* і центромери 17.

Для встановлення остаточного результату для пацієнтів з РМЗ, які мають сумнівний результат статусу *HER-2/Neu* за результатами стандартного дослідження FISH подвійним зондом *HER-2/Neu* і CEP 17, використовують такі маркери, як TP53 (17p13.1), Smith-Magenis Syndrome Critical Region (SMSCR) (17p11.2) і RARA (17q21.1). Оцінка сигналів додаткових зондів до ділянок хромосоми 17 може забезпечити точніше визначення числа хромосом 17 на клітину, ніж тільки CEP 17 [4].

Метою роботи є оцінка практичного значення змін, запроваджених згідно з рекомендаціями ASCO/CAP 2013, для діагностики випадків визначення експресії гена *HER-2/Neu* методом FISH щодо сумнівних (невизначених).

Матеріали і методи

У дослідження включені результати проведення FISH аналізу зразків 21 жінки, яким попередньо встановлено сумнівний результат FISH тесту мутаційного статусу гена *HER-2/Neu*. Визначення мутаційного статусу вище згаданого гена здійснювали за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* на базі відділу медичної генетики «Національний науковий центр радіаційної медицини» НАМН України, керуючись останніми рекомендаціями ASCO/CAP від 2013 року, з використанням набору PathVysion (Vysis, Downers Grove, США).

Для з'ясування точного статусу гена *HER-2/Neu*, щоб виключити ко-ампліфікацію гена *HER-2/Neu* і центромерної ділянки хромосоми 17, вибрали маркер.

Перед гібридизацією *in situ* зразки регідували в трьох змінах етанолу: 100, 90 та 70 %-ному (по 5 хвилин в кожній) промивали 5 хвилин в PBS. Препарати прогрівали 20–30 хвилин в цитратному буфері в паровій бані, потім ополіскували в PBS, інкубували в розчині пронази в концентрації 100 мкг/мл в PBS протягом 3 хвилин за температури 37°C. Далі в глибоких склянках за кімнатної температури препарати ополіскували в PBS, дегідрували в трьох змінах етанолу: 70, 90 та 100 %-ному (по 2 хвилини в кожній). Препарати денатурували 15 хвилин при 75°C в 70 %-ному розчині формаміду в 2ЧSSC (рН 7,0). Після денатурації препарати дегідрували в трьох змінах охолодженого етанолу: 70, 90 та 100 %-ному (по 5 хвилин в кожній). Паралельно за температури 75°C протягом 5 хвилин денатурували пробу Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe. Потім на термоплиті за температури 37°C на означену ділянку предметного скла наносили денатовану пробу, накривали її покривним скельцем, краї якого промазували гумовим клеєм. Препарат інкубували у вологій камері протягом 16 годин за температури 37°C. Після інкубації з препаратів знімали покривні скельця, у темряві за кімнатної температури ополіскували в 0,3 %-ному розчині NP 40 в 2ЧSSC, промивали 2 хвилини в 0,3 %-ному розчині NP 40 в 2ЧSSC за температури 73°C.

Далі за кімнатної температури протягом 5 хвилин препарати промивали у DAPI (4',6'-діамідін-2-феніліндол) в концентрації 150 нг/мл в 2ЧSSC, ополіскували в дистильованій воді, висушували на повітрі і наносили реагент, який запобігає вицвітання препарату (Vector

Laboratories, США). Препарати після гібридизації зберігали за температури мінус 20°C.

Для перегляду препаратів використовували флуоресцентний мікроскоп із пристроями захвату зображень, фільтрами для DAPI, FITC, Spectrum Orange, ртутною лампою 100 Вт Olympus BX 51 з програмою аналізу зображень CytoVision/V. 3.00 build 61 (Applied Imaging Corp., США). У кожному випадку аналізувалося від 20 до 60 інтерфазних клітин. При розрахунку співвідношення середньої кількості копій гена *HER-2/Neu* на клітину до середнього числа хромосом 17 використовували кількість копій гена *TP53* в якості референтного значення для числа хромосом 17, оскільки CEP17 може бути частиною амплікона.

Результати та обговорення

У ході визначення мутаційного статусу гена *HER-2/Neu* в період з 2007 по 2016 рр. дослідили 797 зразків РМЗ методом FISH. Із них 361 випадок оцінили, керуючись рекомендаціями ASCO/CAP від 2013 року. За рекомендаціями ASCO/CAP від 2007 року, виявлення сумнівних випадків серед українських жінок складало 1,4 % (6 з 436 зразків). За використання рекомендацій ASCO/CAP від 2013 року ця частка зросла і складала 4,2 % (15 із 361 зразка). Схожу тенденцію збільшення відсотка сумнівних результатів після ведення останніх рекомендацій встановлено в аналогічних дослідженнях учених щодо інших когорт у різних країнах [14].

За використання рекомендацій 2007 року, існувала невелика частка хворих із невизначеним результатом, щодо яких неможливо було встановити мутаційний статус *HER-2/Neu*. Останні оновлення, збільшуючи групу пацієнтів із сумнівним результатом визначення експресії *HER-2/Neu* методом FISH, уможливають уточнення цього результату в усіх випадках. Це досягається шляхом додаткових досліджень зразків пацієнтів із сумнівним результатом. На таких зразках додатково виконували FISH-аналіз на парафінових зрізах тканин для встановлення кількості гена *TP53* з метою виключення ко-ампліфікації гена *HER-2/Neu* і центромерної ділянки хромосоми 17. Знаючи кількість сигналів гена *TP53*, використовували це значення як референтне для числа хромосом 17. Після вирахування співвідношення кількості сигналів гена *HER-2/neu* до кількості сигналів гена *TP53* всі класифіковані до цього випадки як сумнівні були класифіковані або як позитивні, або як нега-

тивні щодо мутаційного статусу гена *HER-2/Neu* при РМЗ. В нашому дослідженні в 6 (40 %) випадках встановлено позитивний результат та у 9 (60 %) випадках – негативний.

Раніше пацієнти з сумнівним результатом FISH отримували терапію як такі, що мали негативний статус стосовно експресії гена *HER-2/Neu*.

Отримані дані наведені в чотирипільній таблиці (табл.) для прорахунку статистично значущої різниці між сумнівними групами, які виявлені за рекомендаціями різних років. Усі випадки, що були проаналізовані до рекоменда-

цій 2013-го року, вважали негативними. Цю групу складає 6 жінок з РМЗ. Група сумнівних випадків, яка була виявлена після 2013 року, налічує 15 жінок РМЗ. В останній групі є розділення між позитивними і негативними висновками. Таким чином, відсутність мутації, досліджену додатковими аналізами, спостерігаємо в 9 пацієнтів, а наявність – в 6-ти.

Виявлено статистично значущу різницю ($\chi^2 = 3,36$, $p > 0,05$) серед сумнівних випадків із відсутністю мутації гена *HER-2/Neu* у групах хворих РМЗ, обстежених згідно з рекомендаціями 2007 та 2013 років.

Таблиця. Чотирипільна таблиця для розрахунку статистично значущої різниці серед сумнівних випадків із відсутністю мутації гена *HER-2/Neu* у групах хворих РМЗ, обстежених, керуючись рекомендаціями до та після 2013-го року

	Відсутність мутації гена <i>HER-2/Neu</i>	Наявність мутації гена <i>HER-2/Neu</i>	Сума, хворі
За критеріями оцінювання до 2013 року	6	0	6
За критеріями оцінювання після 2013 року	9	6	15
Сума, хворі	15	6	21

Примітка. $\chi^2 = 3,36$, $p > 0,05$.

Висновки

1. За використання рекомендацій ASCO/CAP 2013 року, значно збільшилася кількість випадків, які класифікуються як сумнівні при проведенні тесту з двокольоровою пробою *HER-2/CEP17* порівняно з використанням рекомендацій ASCO/CAP 2007 року (з 1,4 % до 4,2 %).

2. На відміну від рекомендацій 2007 року,

рекомендації ASCO/CAP 2013 року уможливають остаточну класифікацію усіх сумнівних випадків як позитивних, так і негативних (за використання додаткових FISH зондів).

3. Використання в якості додаткового зонду *P53/CEP17* слід вважати раціональним для перевірки належності сумнівних випадків до категорії позитивних або негативних.

Література

1. Limentani S.A., Brufsky A.M., Erban J.K., Jahanzeb M., Lewis D. Phase II study of neoadjuvant docetaxel, vinorelbine, and trastuzumab followed by surgery and adjuvant doxorubicin plus cyclophosphamide in women with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – V. 25. – P. 1232–1238. doi: <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.05.3306>.
2. Nitta H., Kelly B.D., Allred C., Jewell S., Banks P., Dennis E., Grogan T.M. The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future [Електронний ресурс] // *Pathology International.* – 2016. – Режим доступу: doi: 10.1111/pin.12407.
3. Fan Y.S., Casas C.E., Peng J., Watkins M., Fan L., Chapman J., Ikpat O.F., Gomez C., Zhao W., Reis I.M. HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2016. – V. 155, № 3. – P. 457–462. doi: 10.1007/s10549-016-3717-z.
4. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., van de Vijver M., Wheeler T.M., Hayes D.F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer // *J Clin Oncol.* – 2007. – V. 25. – P. 118–145. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2775.
5. Hammond E.H., Wolff A.C., Hayes D.F., Schwartz J.N. Reply to Sauter G. et al. // *J Clin Oncol.* – 2009. – V. 27. – P. 153–154. doi: 10.1200/JCO.2009.24.0366.

6. Hammond M.E., Hayes D.F., Wolff A.C. Clinical notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer // J Clin Oncol. – 2011. – V. 29. – P. 458.
7. Wolff A.C., Hammond M.E., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R.B., Mangu P.B., Paik S., Perez E.A., Press M.F., Spears P.A., Vance G.H., Viale G., Hayes D.F. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update // Arch Pathol Lab Med. – 2014. – V. 138, № 2. – P. 241–256.
8. Hyun C.L., Lee H.E., Kim K.S., Kim S-W, Kim J.H., Choe G., Park S.Y. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer // J. Clin. Pathol. – 2008. – V. 61. – P. 317–321.
9. Muller K.E., Marotti J.D., Memoli V.A., Wells W.A., Tafe L.J. Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 Guideline Updates at an Academic Medical Center That Performs Primary HER2 FISH Testing: Increase in Equivocal Results and Utility of Reflex Immunohistochemistry // Am J Clin Pathol. – 2013. – V. 144. – P. 247–252.
10. Long T.H., Lawce H., Durum C., Moore S.R., Olson S.B., Gatter K., Troxell M.L. The New Equivocal: Changes to HER2 FISH Results When Applying the 2013 ASCO/CAP Guidelines // Am J Clin Pathol. – 2015. – V. 144. – P. 253–262.
11. Huiyong J., Xiaoyan B., Fanjun M., Cheng Z., Xuefeng Z. Evaluation of chromosome 17 polysomy in breast cancer by FISH analysis of whole nuclei, and its clinicopathological significance // Oncol Lett. – 2014. – V. 7. – P. 1954–1958.
12. Kristen E. Muller D.O., Jonathan D., Marotti M.D., Vincent A., Memoli M.D., Wendy A., Wells M.D., Laura J., Tafe M.D. Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 Guideline Updates at an Academic Medical Center That Performs Primary HER2 FISH Testing: Increase in Equivocal Results and Utility of Reflex Immunohistochemistry // American Journal of Clinical Pathology. – 2015. – V. 144. – P. 247–252.
13. Wells M.D., Laura J., Tafe M.D., Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 Guideline Updates at an Academic Medical Center That Performs Primary HER2 FISH Testing: Increase in Equivocal Results and Utility of Reflex Immunohistochemistry // American Journal of Clinical Pathology. – 2015. – V. 144, № 2. – P. 247–252.

KLIMUK B.T.^{1,2}, DUGAN O.M.¹, STEFANOVICH A.V.², KLYMENKO S.V.²

¹ National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute",
Ukraine, 03056, Kiev, Prospect Peremogy, 37, e-mail: bogdana11@ukr.net

² State Institution National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of
Ukraine,

Ukraine, 02000, Kiev, Prospect Peremogy, 119, e-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk

RESULTS OF MUTATION STATUS GENE *HER-2/NEU* IN PATIENTS WITH BREAST CANCER IN UKRAINE

Aim. Detection of changes in epidermal growth factor receptor 2 (*HER-2/Neu*) in tumor cells is critical to patient prognosis, prediction of response to standard chemotherapy, and perspectives for the treatment of anti-*HER-2* therapy.

Methods. The research study was conducted according to the recommendations of ASCO/CAP 2013 to diagnose cases of determining gene expression *HER-2/Neu* by FISH. To identify the exact status of the gene *HER-2/Neu* TP53 marker was selected. **Results.** A statistically significant difference ($\chi^2 = 3.36$, $p > 0.05$) was found among the questionable cases of mutated *HER-2 / neu* in the patient groups which was surveyed according to 2007 and 2013 years recommendations.

Conclusions. In comparison with 2007 ASCO/CAP 2007 (from 1.4 % to 4.2 %) 2013 ASCO/CAP showed more cases which was classified as doubtful during the test with two-color breakdown *HER-2/CEP17*

Keywords: *HER-2/Neu*, mutation status, FISH, centromere area, TP53.